

犬瘟熱病毒融合蛋白基因之多變性分析

李敏旭*、蔡國榮、陳麗璇、陳卿允、劉玉彬、李淑慧

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 犬瘟熱 (canine distemper; CD) 是一種分佈於全世界的犬隻高傳染力疾病，病毒封套上的血球凝集素 (hemagglutinin; H) 和融合蛋白 (fusion protein; F) 二種糖蛋白基因的演化常與流行相關連，不同的是大部分的研究著重在血球凝集素而融合蛋白的演化分析則甚少。本實驗針對台灣的病毒株進行全融合蛋白基因的完整序列分析，在親緣性分析中顯示大部分的病毒株與發現在日本及中國的病毒株相近，但基因上有別於疫苗株。整個融合蛋白基因最顯著的變異區出現在 5' 端的前肽區 (1-135)，本地病毒株間的序列相似性為 86-100%，但與疫苗株相似性則在 64-67%。另外，也發現在具地理屏障的花蓮犬隻所採到病毒株形成一個新的基因分支。

關鍵字：融合蛋白、犬瘟熱病毒、基因演化、前肽區

緒言

犬瘟熱 (CD)，是感染犬瘟熱病毒 (CDV) 所造成的一種伴有免疫抑制之全身性疾病，病毒的複製在呼吸道和淋巴組織 [10]。該病毒是具有封套，為副黏液病毒 (paramyxoviridae) 家族中的麻疹病毒屬 (Morbillivirus) [4]。犬瘟熱病毒的基因全長約為 15.7 kb，為單股負向 RNA 病毒可轉譯出 8 個病毒蛋白。基因體 RNA 是緊密連結的核蛋白 (nucleocapsid; N) 與另外兩個病毒蛋白，即 RNA 聚合酶 (RNA polymerase; L) 和磷蛋白 (phosphoprotein; P)，共同構成核糖核蛋白 (RNP) 的複合體來啟動病毒基因體的複製和轉錄。封套糖蛋白含血球凝集素和融合蛋白則參與病毒進入宿主細胞，[18,19,20] 以及抗原決定 [2,6,18]。

犬瘟熱病毒融合蛋白開放閱讀框的編碼為 662 個氨基酸，其中包括經轉譯後蛋白質水解產生的前肽 (1-135) 和 F1 (225-662) 和 F2 (136-224) 次單位。最初的融合蛋白為轉譯約 78 kDa 的前體蛋白 (Pro-F0)，包含 F0 蛋白與藉由細胞訊號肽蛋

白酶切除的前肽 (pre-peptide) [19]。這 60 kDa 的 F0 蛋白再由細胞蛋白酶裂解成二硫化物連結的 F1 和 F2 次單位 [16]。經由累積的數據顯示，改變位於前肽的訊號蛋白可調節病毒的融合和透過影響融合蛋白功能來影響 CDV 的神經毒性 [15,19]。融合蛋白和/或血球凝集素蛋白遺傳基因的變異，已被認定可能為疫苗失敗造成犬瘟熱爆發的原因 [3,7,11,17]。

迄今為止，大多數研究犬瘟熱的分子流行病學都集中在 H 基因，而 F 基因則是相當稀少。這項研究的目的是探討目前台灣流行的犬瘟熱病毒株融合蛋白的基因演化，以及提高對於這主要抗原在犬瘟熱疫情可能扮演角色的分析。據我們所知，這是第一份報告完整融合蛋白基因序列的大規模演化。

材料與方法

樣本收集

經過 19 個月期間 (2005 年 11 月至 2007 年 5 月) 的收集，共篩選到 42 個樣品為犬瘟熱病毒感染。採樣點包括動物獸醫診所接受治療的寵物和台灣各地

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

包括金門縣動物收容所的流浪狗(圖1)。收集的樣本包括從存活的犬隻之全血,尿及眼、鼻分泌物,以及斃死犬隻解剖所採取之腦、肺、膀胱。

病毒核酸萃取

病毒的核酸萃取為以 200 μ L 組織乳劑、血液或是其它樣本應用核酸自動萃取系統進行核酸萃取〔MagNA pure compact nucleic acid isolation kit and system (Roche Applied Science)〕。核酸含量則以分光光度法測定。

基因增幅與選殖定序

樣本以 RT-PCR 檢測病毒血球凝集素基因篩選出犬瘟熱病毒的存在,使用在 H 及 F 基因增幅之引子是依據已發表的序列設計[12],相關序列及位置如圖2及表1所示。萃取之核酸以引子 A / B 組用 one-step RT-PCR kit (Bertec; Taiwan) 進行 H 基因的增幅,熱循環反應條件為 42 $^{\circ}$ C 50 分鐘, 95 $^{\circ}$ C 2 分鐘, 35 次 95 $^{\circ}$ C 40 秒; 50 $^{\circ}$ C 50 秒; 72 $^{\circ}$ C 50 秒; 和最後一階段為 72 $^{\circ}$ C 7 分鐘。該產物再以巢式 PCR 搭配引子 C/D 組做再增幅來檢測樣本是否含有犬瘟熱病毒。

接著針對於偵測到含犬瘟熱病毒的樣本進行融合蛋白基因的擴增與選殖定序,用上述同樣的方法,引子 CDF1/CDF2 組最初是用來放大完整的 F 基因,但為了方便日後的基因選殖及定序,隨後的巢式 PCR 擴增片段,則採用涵蓋 F 基因不同片段的兩套內部引子 (CDF3/CDF4 和 CDF5/CDF6)。巢式 PCR 的條件如下: 95 $^{\circ}$ C 2 分鐘, 循環 35 次 95 $^{\circ}$ C 40 秒; 50 $^{\circ}$ C 1 分鐘; 72 $^{\circ}$ C 為 1.5 分鐘; 最後一階段 72 $^{\circ}$ C 7 分鐘。所有擴增熱循環在 DNA 熱循環儀進行 (Gene-Amp PCR system 9700, PerkinElmer) 和以 2%瓊脂凝膠進行電泳並回收產品。為了驗證 PCR 產物的真實性, DNA 片段從凝膠片以凝膠萃取試劑套組 (Qiagen gel extraction kit) 回收,並選殖到 PCR II 載體 (TOPO TA cloning kit, Invitrogen), 挑選出嵌入 DNA 片段之質體進行自動定序反應 (Mission Biotech)。42 株完整長度和蛋白基因序列在 GenBank 中登錄號為 EU191985- EU192026。

親緣性分析

本試驗中所得到的病毒株與先前已被發表在 GenBank 中的序列 (包括疫苗株序列) 使用 Megalign 程式 (DNASTAR, Madison, WI) 來進行序列的相似性比對,親緣性分析之樹狀圖以 Mega 3.1 版軟體中 neighbor-joining 程式進行並重複計算 1000 次來繪製可信度較高之族譜樹狀圖。

結果

融合蛋白基因之序列分析

以表2中所列出之病毒株進行融合蛋白基因的親緣分析,由於地域的封閉性與隔離,在圖3可見來自相同城市的病毒株有著共同的分支,為方便比對進行則由每個分支擇一城市代表病毒株來進行分析。而融合蛋白轉譯前體蛋白 (pre-FO) 再分解為前胜肽 (pre-peptide) 及 F2、F1 三個部分,因此我們分別針對轉譯成不同部位氨基酸的序列來進行分析比對。

前胜肽 (1-135個胺基酸) 比對分析

表3中所示為不同犬瘟熱病毒株的前135個氨基酸之比對,台灣本地病毒株與疫苗株的差異性在 43%至49%,在這代表的10株本地病毒株中除了基隆與花蓮採集之病毒株外差異性均小於3%,基隆病毒株 TW-KL1 與其它本地病毒株差異性在 6.1-8.6%,而花蓮病毒株 TW-HL1 為 9.4-15.5%。而在核 酸序列的比對上比氨基酸序列比對有較大的分歧。

F1 (225-662) 和 F2 (136-224) 區域比對分析

相對於前胜肽區域的高變異性,在F1區域比對分析顯示出所有本地病毒株呈現高度的一致性 (97.9-99.8%) (表4),與疫苗株相似性在 94.3-96.1%;而在3個區域中,F2區域則有最高的相似性 (表3, 4, 5)。

犬瘟熱病毒融合蛋白基因之親緣樹分析

圖3、4分別為融合蛋白全長及前胜肽區域的親緣樹分析,顯示有相近的親緣樹關係,而來自同一城市的病毒株在基因親緣上被歸類在共同的群組上。在

前勝肽區的比對上，四株花蓮的病毒株 (TW-HL) 歸類在A群，3/5的台中病毒株歸類為E群，14/15的高雄病毒株被歸類為B1及B2二群，台東及金門病毒株則全歸類在C群，由親緣性的歸類與病毒來源地的相關聯結可見基因分群與地域性有緊密的關連性。我們將台灣的病毒株與其它地區病毒株 (表2) 進行親緣樹分析來了解其演化之關聯性 (圖4)，結果可見台灣目前流行病毒株親近於中國病毒株 (GN, SCO1, ZDO1) 及日本病毒株 (Yanaka)，顯示這幾個地區的病毒株可能為同源演化而來，值得注意的是這些病毒與疫苗株 (Onderstepoort) 已發展出明顯的演化差異性，另外花蓮病毒株 (TW-HL) 單獨形成一特別分支，而基隆病毒株 TW-KL1 則與台灣流行株不同群反而親近於中國病毒株 ZDO1。

N 端糖基化 (N-glycosylation) 位置之推測

如圖 5 所示，2 株目前在台灣常見的病毒代表株的融合蛋白前體蛋白 (pre-FO) 之蛋白質序列比對，除了在疫苗株 (Onderstepoort) 常見的 5 個糖基化位置 (NXS / T) 外還有 2 個可能糖基化的位置：一個在序列位置 108-110 (N-A-T) 可在我們這些野外病毒株發現，另一個在序列位置 607-609 (N-F-S) 則出現在高雄病毒株 (TW-KS) 所歸類之 B1 群的病毒株 (圖 4)。

討論

本研究最初的目標是透過比較融合蛋白基因序列來探討當前在台灣流行的犬瘟熱病毒株與疫苗株的差異，藉此來推測近期施打疫苗動物爆發犬瘟熱疫情的原因。基因親緣樹分析顯示這些野外病毒株可能因地域性的隔離有所差異，但彼此密切相關，也有一獨立分支與中國及日本病毒株歸類在同一群，不過地理上的區隔明白顯示出疫苗株 (Onderstepoort) 與亞洲、北美洲、歐洲病毒株有明顯差異，在本試驗所有的42株病毒株雖然可能來自一個共同的祖先，但其中有4

株 (TW-HL 1, 2, 3, 4) 來自位在台灣東北部的花蓮，出現与其它地區病毒株有基因上的顯著差異，而這4株病毒株與日本及中國病毒株較相似，推測可能是病毒的來源地，病毒侵入具地理隔離的花蓮後持續爆發及循環所演化而來。這種情況可能也適用於的 TW-KL1 的推測，這株病毒株與中國病毒株 (ZDO1) 歸類同一基因群病毒，而由於基隆市是一個重要的國際港口，在此環境下引進新型犬瘟熱病毒株的機率性是很高的。

犬瘟熱病毒融合蛋白的前勝肽區135個胺基酸之多變異性已經被證實在四個疫苗株與德國野外病毒株的基因序列比對[19]。在此實驗中我們觀察到野外株與疫苗株出現超過49%的差異性，而在F1區域則有較少的變異性，F2區域則是此基因中相似度最高的。

一個成熟的病毒顆粒表面是不具有前勝肽，故此蛋白需要在輸送到細胞表面前以水解蛋白切割掉前勝肽蛋白而轉變為成熟的融合蛋白[19]。然而，一些報告已經顯示出這個前勝肽的潛在功能間接影響F蛋白融合活動，從而可能導致神經毒力[15,19]。因此在台灣病毒株基因於前勝肽基因出現頻繁的變化可能是導致犬隻感染病毒發病的一個因素。

近年來日本犬瘟熱病毒株的N端糖基化位置增加[5,7,8]。而在台灣，2株目前在台灣常見的病毒代表株的融合蛋白前體蛋白 (pre-FO) 之蛋白質序列比對 (圖5)，除了在疫苗株 (Onderstepoort) 常見的5個糖基化位置 (NXS / T) 外還有2個可能糖基化的位置，累積的資料顯示病毒封套蛋白N端糖基化的數目可能關鍵在生命週期和如與細胞表面受體結合或保護對抗被抗體中和之致病機制[1,9,13,14]，因此，融合蛋白出現額外N端糖基化點可能會導致改變蛋白質結構與調整相應的抗原性或甚至毒力。然而，這將需要更多的工作進一步調查這種可能性。

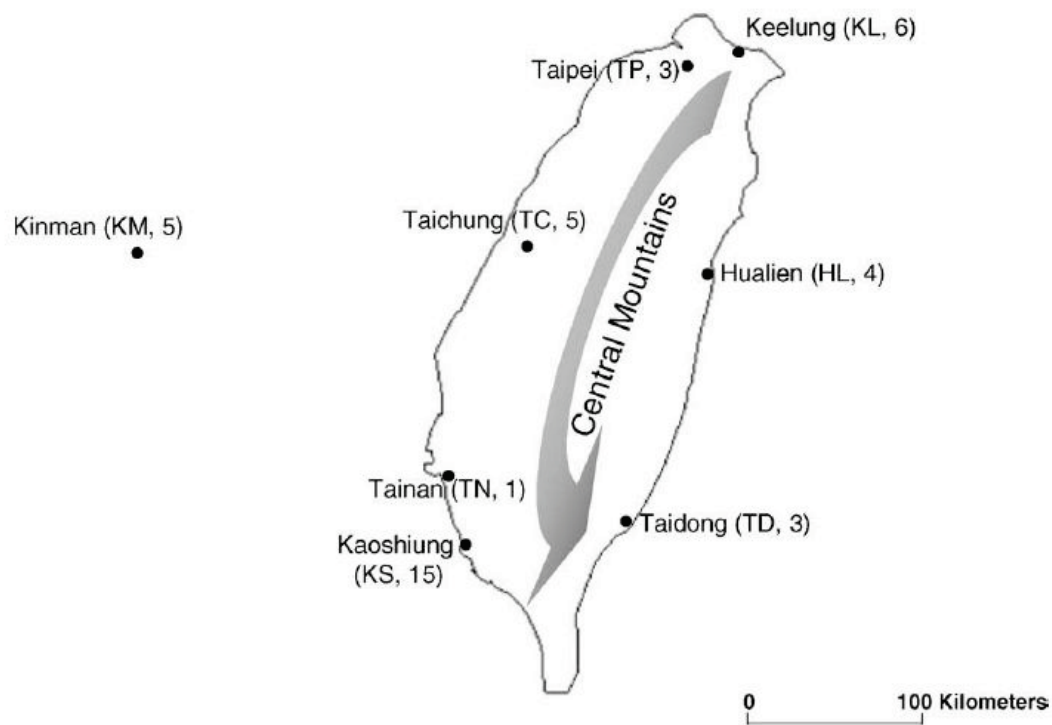


圖 1、以台灣地圖標示收集樣本的所在城市及數量。

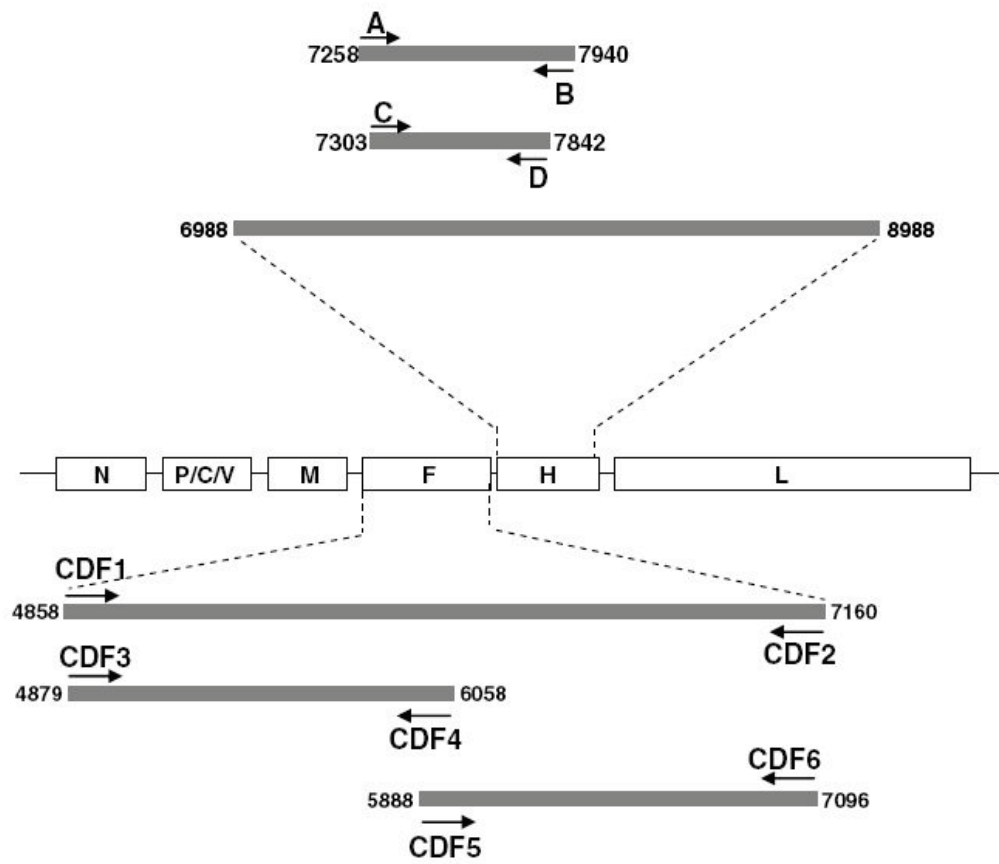


圖 2、本試驗中引子序列之相關位置圖示。

犬瘟熱病毒融合蛋白基因之多變性分析

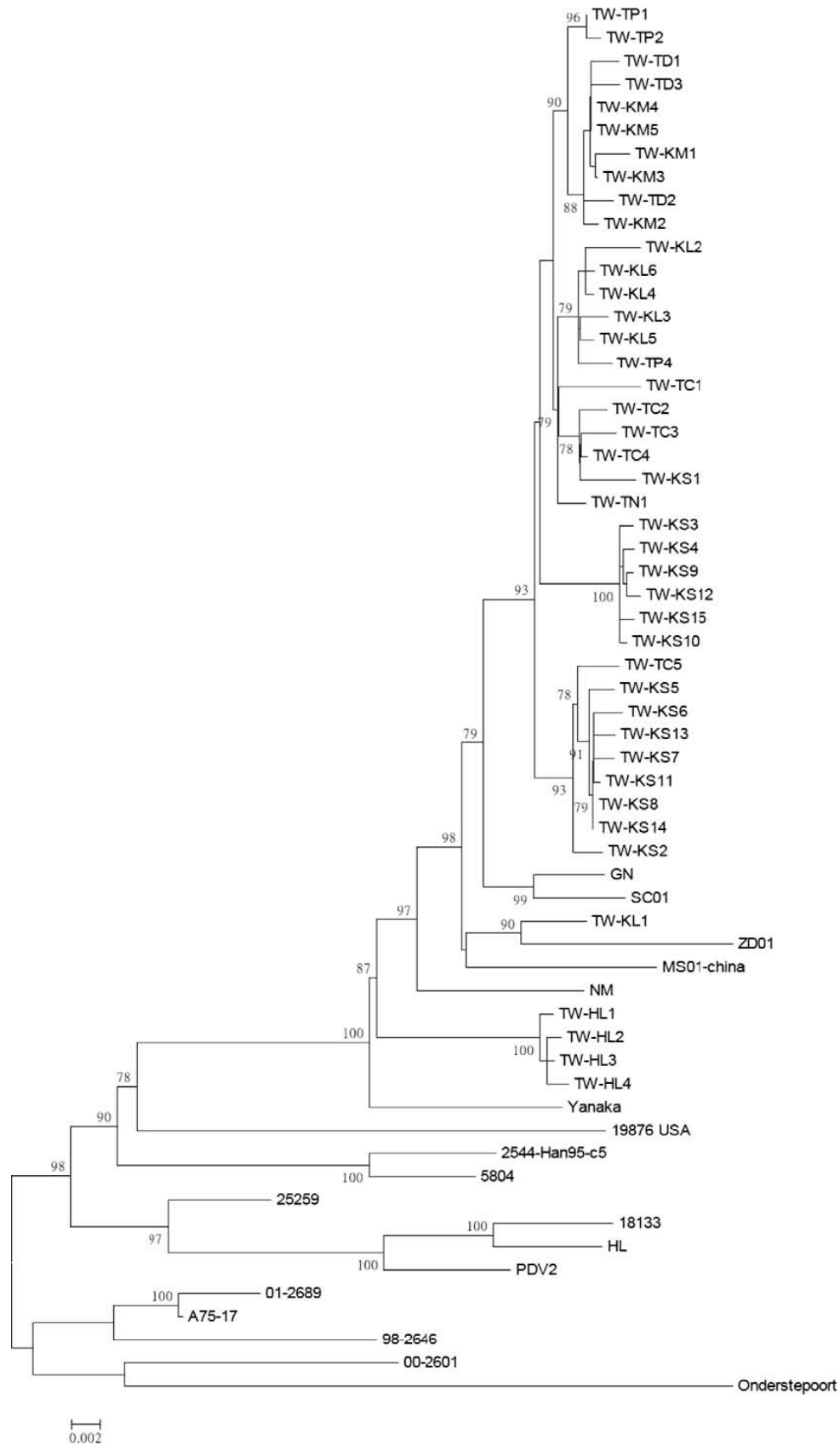


圖3、分析犬瘟熱病毒株融合蛋白基因全長序列之親緣關係。標記“TW”的是在本研究中台灣狗隻病毒株。其他序列從 GenBank 獲得，詳情載於表1。此親緣樹分析以Mega 3.1 程式中的neighbor-joining method，並進行重複重新採樣1000次來計算結點。

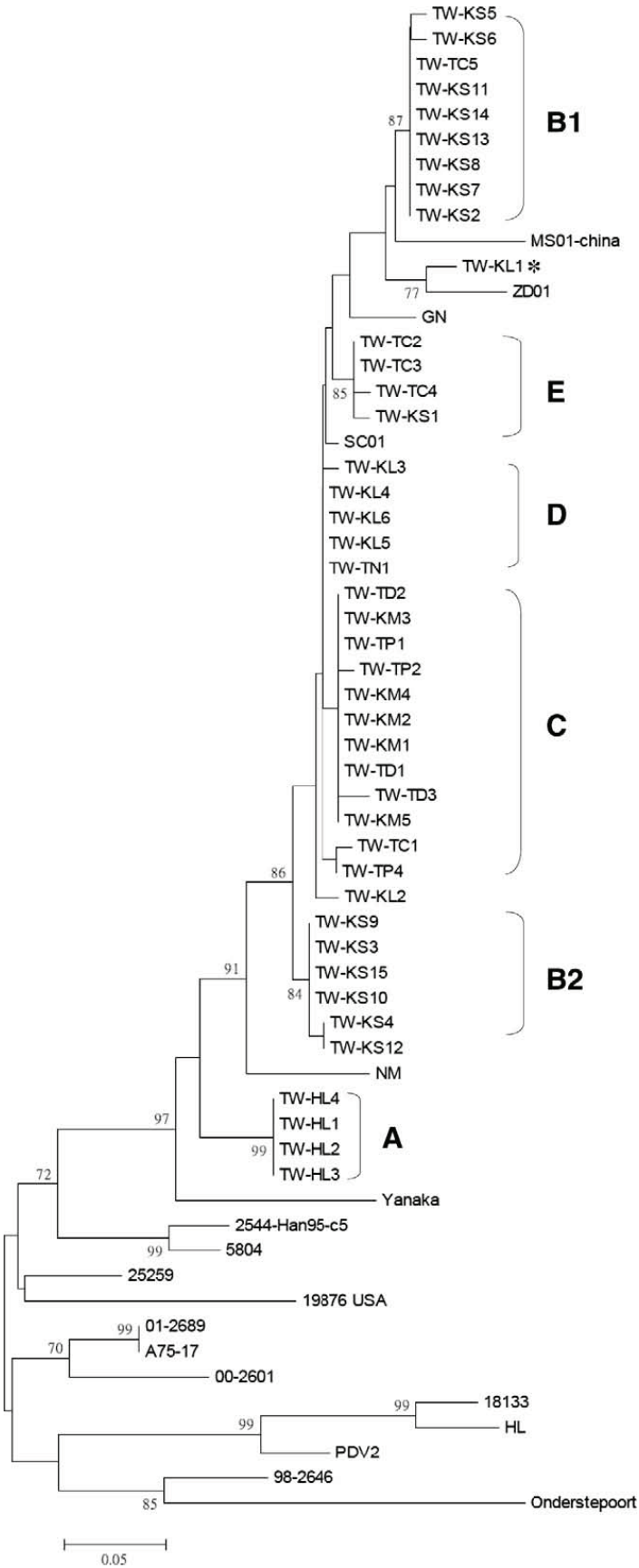


圖4、分析犬瘟熱病毒株前肽基因序列之親緣關係。此親緣樹分析以 Mega 3.1 程式中的 neighbor-joining method，並進行重複重新採樣1000次來計算結點。

犬瘟熱病毒融合蛋白基因之多變性分析

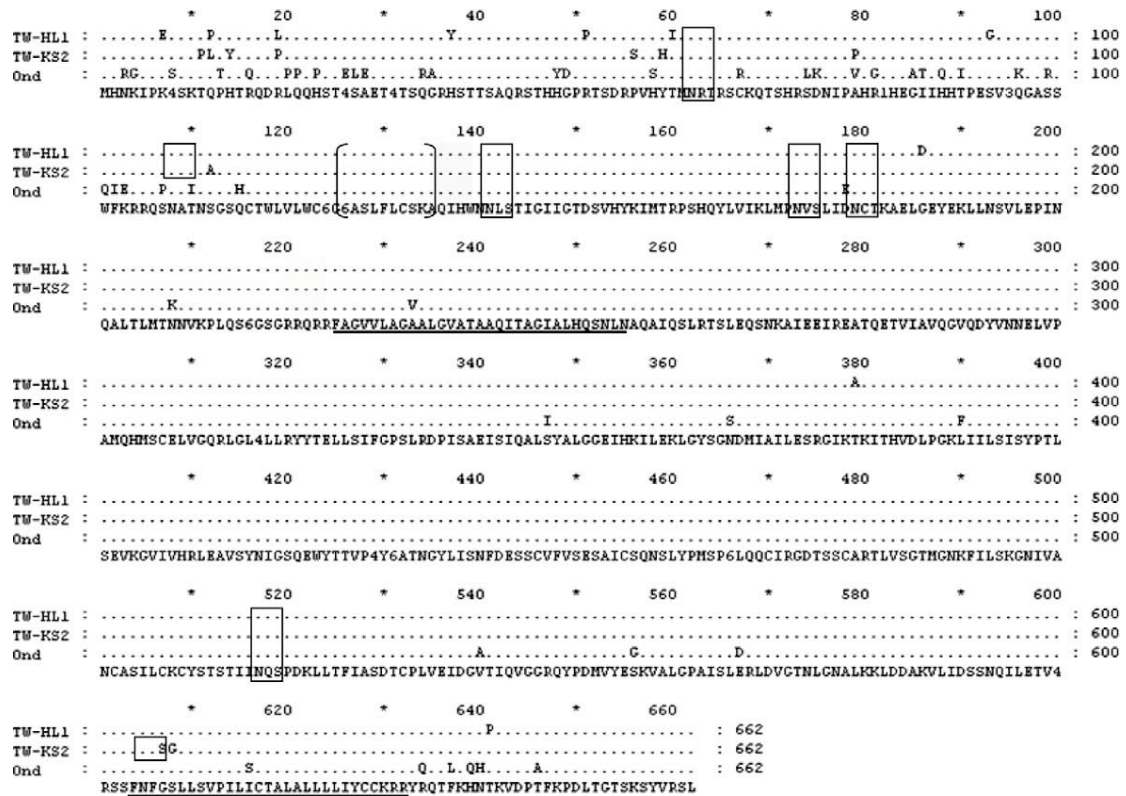


圖5、比對2株來自台灣的領域代表株和疫苗Onderstepoort株犬瘟熱病毒融合蛋白之氨基酸序列。方框表示可能的N端糖基化的位置。

表 1、本試驗中使用之引子序列及相關位置

primer	Target gene	Nucleotide position	Sequence (5'-3')	Direction
A	H	7288-7307	TAGCAGATTGCTGAAAGAGG	Sense
B	H	7940-7921	CCACTGCTATAGTACATACC	Antisense
C	H	7303-7322	AGAGGATATGGAGAAATCAG	Sense
D	H	7842-7823	AACCCTATYTCAAAGACTCG	Antisense
CDF1	F	4858-4876	GGACGCAGCAAGCCAACAG	Sense
CDF2	F	7160-7140	CTGTCACTAAGGACAGCTTGG	Antisense
CDF3	F	4879-4896	CAACCAAGTCCACCAATC	Sense
CDF4	F	6058-6038	CGACTCTCCAAAATTGCAATC	Antisense
CDF5	F	5888-5909	GCTTAGGTATTACACCGAGTTG	Sense
CDF6	F	7096-7077	GTCTTGGTAGGAGAGCATTG	Antisense

表 2、親緣樹分析中使用之犬瘟熱病毒株

Strains	Origins	Accession Numbers
Onderstepoort	Vaccine	AF305419
SC01	China	EF596902
HL	China	EF596901
ZD01	China	EF596904
GN	China	EF596900
NM	China	EF596903
Yanaka	Japan	D87949*
5804	USA	AY386315
A75-17	Switzerland	AF164967
00-2601	USA	AY443350
98-2646	USA	AY542312
19876 USA	USA	AY964110
2544-han95-c5	Germany	AJ007711
18133	USA	AY964108
25259	USA	AY964114
01-2689	USA	AY649446
PDV-2	UK	D10371

表 3、不同犬瘟熱病毒株比對前勝肽（前 1-135 個氨基酸）氨基酸序列之比較

	TW-TP1	TW-TD3	TW-KM1	TW-KL2	TW-TC1	TW-TN1	TW-KS2	TW-KS3	TW-KL1	TW-HL1	Onderstepoort
TW-TP1		98.5	100.0	97.8	97.8	99.3	96.3	97.1	93.4	89.7	64.7
TW-TD3	1.5		98.5	96.3	96.3	97.8	94.9	95.6	91.9	88.2	64.0
TW-KM1	0.0	1.5		97.8	97.8	99.3	96.3	97.1	93.4	89.7	64.7
TW-KL2	2.2	3.8	2.2		97.1	98.5	94.1	96.3	92.6	90.4	65.4
TW-TC1	2.2	3.8	2.2	3.0		98.5	94.1	96.3	92.6	90.4	64.7
TW-TN1	0.7	2.2	0.7	1.5	1.5		95.6	97.8	94.1	90.4	65.4
TW-KS2	3.8	5.3	3.8	6.1	6.1	4.6		93.4	94.1	89.0	66.9
TW-KS3	3.0	4.6	3.0	3.8	3.8	2.2	6.9		93.4	91.2	65.4
TW-KL1	6.9	8.6	6.9	7.8	7.8	6.1	6.1	6.9		86.0	65.4
TW-HL1	11.1	12.8	11.1	10.2	10.2	10.2	12.0	9.4	15.5		66.9
Onderstepoort	47.5	48.8	47.5	46.1	47.5	46.1	43.5	46.1	46.1	43.5	

表 4、不同犬瘟熱病毒株比對 F1 蛋白 (225-662 個氨基酸) 氨基酸序列之比較

	TW- TP1	TW- TD3	TW- KM1	TW- KL2	TW- TC1	TW- TN1	TW- KS2	TW- KS3	TW- KL1	TW- HL1	Onderstepoort
TW-TP1		99.5	99.1	98.9	98.2	99.3	99.3	99.3	99.1	99.8	96.1
TW-TD3	0.5		99.1	98.9	98.2	99.3	99.3	99.3	99.1	99.8	95.7
TW-KM1	0.9	0.9		98.4	97.7	98.9	98.9	98.9	98.6	99.3	95.2
TW-KL2	1.1	1.1	1.6		97.5	98.6	98.6	98.6	98.4	99.1	95.0
TW-TC1	1.8	1.8	2.3	2.6		97.9	97.9	97.9	98.2	98.4	94.3
TW-TN1	0.7	0.7	1.1	1.4	2.1		99.1	99.1	98.9	99.5	95.4
TW-KS2	0.7	0.7	1.1	1.4	2.1	0.9		99.5	98.9	99.5	95.4
TW-KS3	0.7	0.7	1.1	1.4	2.1	0.9	0.5		98.9	99.5	95.4
TW-KL1	0.9	0.9	1.4	1.6	1.8	1.1	1.1	1.1		99.3	95.7
TW-HL1	0.2	0.2	0.7	0.9	1.6	0.5	0.5	0.5	0.7		95.9
Onderstepoort	4.0	4.5	4.9	5.2	5.9	4.7	4.7	4.7	4.5	4.2	

表 5、不同犬瘟熱病毒株比對 F2 蛋白（136-224 個氨基酸）氨基酸序列之比較

	TW-TP1	TW-TD3	TW-KM1	TW-KL2	TW-TC1	TW-TN1	TW-KS2	TW-KS3	TW-KL1	TW-HL1	Onderstepoort
TW-TP1		100.0	100.0	98.9	100.0	100.0	100.0	100.0	98.9	100.0	96.7
TW-TD3	0.0		100.0	98.9	100.0	100.0	100.0	100.0	98.9	100.0	96.7
TW-KM1	0.0	0.0		98.9	100.0	100.0	100.0	100.0	98.9	100.0	96.7
TW-KL2	1.1	1.1	1.1		98.9	98.9	98.9	98.9	97.8	98.9	95.6
TW-TC1	0.0	0.0	0.0	1.1		100.0	100.0	100.0	98.9	100.0	96.7
TW-TN1	0.0	0.0	0.0	1.1	0.0		100.0	100.0	98.9	100.0	96.7
TW-KS2	0.0	0.0	0.0	1.1	0.0	0.0		100.0	98.9	100.0	96.7
TW-KS3	0.0	0.0	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0		98.9	100.0	96.7
TW-KL1	1.1	1.1	1.1	2.3	1.1	1.1	1.1	1.1		98.9	95.6
TW-HL1	0.0	0.0	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1		96.7
Onderstepoort	3.4	3.4	3.4	4.6	3.4	3.4	3.4	3.4	4.6	3.4	

参考文献

1. Aguilar HC, Matreyek KA, Filone CM, Hashimi ST, Levrony EL, Negrete OA, Bertolotti-Ciarlet A, Choi D Y, McHardy I, Fulcher J A, Su S V, Wolf M C, Kohatsu L, Baum L G, Lee B. N-glycans on Nipah virus fusion protein protect against neutralization but reduce membrane fusion and viral entry. *Journal of Virology*, 80: 4878 - 4889, 2006.
2. Diallo A. Morbillivirus group: genome organisation and proteins. *Veterinary Microbiology*, 23: 155 - 163, 1990.
3. Gemma T, Watari T, Akiyama K, Miyashita N, Shin YS, Iwatsuki K, Kai C, Mikami T. Epidemiological observations on recent outbreaks of canine distemper in the Tokyo area. *Journal of Veterinary Medical Science*, 58: 547 - 550, 1996.
4. Griffin DE. Measles virus. In: Howley PM, Knipe DM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, Roizman B, Straus SE (Eds.) *Fields Virology*, fourth ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, USA, pp. 1401 - 1441, 2001.
5. Harder TC, Kenter M, Vos H, Siebelink K, Huisman W, van Amerongen G, Orvell C, Barrett T, Appel MJ, Osterhaus AD. Canine distemper virus from diseased large felids: biological properties and phylogenetic relationships. *Journal of General Virology*, 77: 397 - 405, 1996.
6. Hirayama N, Senda M, Nakashima N, Takagi M, Sugiyama M, Yoshikawa Y, Yamanouchi K. Protective effects of monoclonal antibodies against lethal canine distemper virus infection in mice. *Journal of General Virology*, 72: 2827 - 2830, 1991.
7. Iwatsuki K, Miyashita N, Yoshida E, Gemma T, Shin Y S, Mori T, Hirayama N, Kai C, Mikami T. Molecular and phylogenetic analyses of the haemagglutinin (H) proteins of field isolates of canine distemper virus from naturally infected dogs. *Journal of General Virology*, 78: 373 - 380, 1997.
8. Iwatsuki K, Miyashita N, Yoshida E, Shin YS, Ohashi K, Kai C, Mikami T. The nucleotide and predicted amino acid sequence of the fusion protein of recent isolates of canine distemper virus in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 60: 381 - 385, 1998.
9. Kim JM, Yun SI, Song BH, Hahn YS, Lee CH, Oh HW, Lee YM. A single N-linked glycosylation site in the Japanese encephalitis virus prM protein is critical for cell type-specific prM protein biogenesis, virus particle release, and pathogenicity in mice. *Journal of Virology*, 82: 7846 - 7862, 2008.
10. Krakowka S. Mechanisms of in vitro immunosuppression in canine distemper virus infection. *Journal of Clinical Laboratory Immunology*, 8: 187 - 196, 1982.
11. Lan NT, Yamaguchi R, Inomata A, Furuya Y, Uchida K, Sugano S, Tateyama S. Comparative analyses of canine distemper viral isolates from clinical cases of canine distemper in vaccinated dogs. *Veterinary Microbiology*, 115: 32 - 42, 2006.
12. Mochizuki M, Hashimoto M, Hagiwara S, Yoshida Y, Ishiguro S. Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of the hemagglutinin genes of recent isolates from dogs in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 2936 - 2942, 1999.
13. Moeller-Ehrlich K, Ludlow M, Beschoner R, Meyermann R, Rima B K, Duprex W P, Niewiesk S, Schneider-Schaulies J. Two functionally linked amino acids in the stem 2 region of measles virus haemagglutinin determine infectivity and virulence in the rodent central nervous system. *Journal of General Virology*, 88: 3112 - 3120, 2007.
14. Moeller K, Duffy I, Duprex P, Rima B, Beschoner R, Fauser S, Meyermann R, Niewiesk S, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J. Recombinant measles viruses expressing altered hemagglutinin (H) genes: functional separation of mutations determining H antibody escape from neurovirulence. *Journal of Virology*, 75: 7612 - 7620, 2001.
15. Plattet P, Cherpillod P, Wiener D, Zipperle L, Vandeveld M, Wittek R, Zurbriggen A. Signal peptide and helical bundle domains of virulent canine distemper virus fusion protein restrict fusogenicity. *Journal of Virology*, 81: 11413 - 11425, 2007.
16. Scheid A, Choppin P W. Two disulfide-linked polypeptide chains constitute the active F

- protein of paramyxoviruses. *Virology*, 80: 54 – 66, 1977.
17. Uema M, Ohashi K, Wakasa C, Kai C. Phylogenetic and restriction fragment length polymorphism analyses of hemagglutinin (H) protein of canine distemper virus isolates from domestic dogs in Japan. *Virus Research*, 109: 59 – 63, 2005.
 18. Von Messling V, Zimmer G, Herrler G, Haas L, Cattaneo R. The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *Journal of Virology*, 75: 6418 – 6427, 2001.
 19. Von Messling V, Cattaneo R. Amino-terminal precursor sequence modulates canine distemper virus fusion protein function. *Journal of Virology*, 76: 4172 – 4180, 2002.
 20. Von Messling V, Oezguen N, Zheng Q, Vongpunsawad S, Braun W, Cattaneo R. Nearby clusters of hemagglutinin residues sustain SLAM-dependent canine distemper virus entry in peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Virology*, 79: 5857 – 5862, 2005.

The Identification of Frequent Variations in the Fusion Protein of Canine Distemper Virus

MS Lee*, KJ Tsai, LH Chen, CY Chen, YP Liu, SH Lee

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract Canine distemper (CD) is a highly contagious disease with a worldwide distribution. Genetic diversity in genes encoding the haemagglutinin (H) and fusion (F) virus envelope proteins have been implicated in the increasing incidence of CD. Unlike the H gene, little is known about the genetic variability of the F gene in this virus. In the present study sequence analysis of the complete coding region of the F protein from CD virus isolates from Taiwan were carried out. Phylogenetic analysis demonstrated that the majority of isolates were similar to those found in neighbouring China and Japan, but were genetically distinct from vaccine strains. Remarkable variations were found scattered throughout the pre-peptide region (residues 1–135). The sequence identity of this region between locally sourced strains and between these strains and vaccine strains was 89% and 64 to 67%, respectively. Analysis suggested a novel strain of distant genetic lineage was present in dogs in the geographically isolated city of Hualien.

Keywords: *Fusion protein, Canine distemper virus, Gene evolution, Pre-peptide region*